

サンフィッシュ科魚類(オオクチバス, ブルーギル)の好中球顆粒

近藤昌和*・柏村直宏・金丸俊介・稲川裕之・高橋幸則

Granules of Neutrophil in Centrarchid Fishes, Large Mouth Bass (*Micropterus salmoides*) and Bluegill (*Lepomis macrochirus*)

Masakazu Kondo*, Naohiro Kashiwamura, Shunsuke Kanamaru, Hiroyuki Inagawa and Yukinori Takahashi

Morphology of neutrophil in large mouth bass, *Micropterus salmoides* and bluegill, *Lepomis macrochirus* was examined by a light microscopy. The neutrophils of both fishes were round or oval in the cellular shapes. Their nuclear shapes varied from round to kidney-shaped. Granules of the neutrophils in both fishes were classified into two types; chromophobic granule (β G) and amorphous basophilic granule (δ G) based on the Romanowsky type staining properties. The β G in both fishes had similar morphology (round or oval, 0.5-1.0 μ m in diameter), but the size of the δ G in black bass was larger than that of bluegill. Cytochemical tests revealed that the β G was peroxidase positive and the δ G was toluidin blue positive.

1 緒 言

真骨魚類の好中球は哺乳類などの高等脊椎動物と同様に、非特異的生体防御機構を担っている^{1, 2)}。ヒトでは好中球の顆粒は染色性や微細構造の違いから、中性好性顆粒(好中性顆粒)とアズール好性顆粒に分類されている。また、顆粒の膜や基質の成分の違いから、アズール(一次)顆粒, 特殊(二次)顆粒, ゼラチナーゼ(三次)顆粒および分泌小胞の4種類に細分されている^{3, 4)}。一方、脊椎動物の進化の過程で早期に出現した魚類では、好中球顆粒の種数に関する報告は少ない。

近年、各種真骨魚類の好中球には、Romanowsky型染色性と形状が異なる複数種の顆粒が存在し、顆粒の種数は魚種によって2~4種類と、相違があることが示されている^{5~9)}。コイ目のコイではエオシン好性顆粒(α 顆粒), 難染色顆粒(β 顆粒)およびアズール好性顆粒(γ 顆粒)の3種類の顆粒の存在が報告されている^{5, 6)}。スズキ目魚類のナイルティラピアとイサキの好中球には、コイと同様に α 顆粒, β 顆粒および γ 顆粒が観察されるが、それらとともに、粗大で不定形の好塩基性顆粒(δ 顆粒)も認められている。しかし、 α 顆粒の形状は、ナイルティラピア

では円形であるのに対して、イサキでは桿形であることが報告されている^{7, 8)}。また、同じスズキ目のメジナでは、 β 顆粒と δ 顆粒は観察されるものの、 α 顆粒と γ 顆粒は認められていない⁹⁾。以上のような魚種間の違いは、系統進化と関連した方向性があると考えられている⁹⁾。しかし、各顆粒の成分については明らかではなく、好中球顆粒の進化的な多様性を明らかにする上で、機能と関連する成分を同定することが望まれる。

本研究では魚類の好中球顆粒の多様性を明らかにする研究の一環として、スズキ目サンフィッシュ科に属するブルーギル*Lepomis macrochirus*における好中球顆粒の種類について調べるとともに、好中球に各種の染色を施して、各顆粒の成分を推定した。また、同科に属するオオクチバス*Micropterus salmoides*についても好中球顆粒の種類を明らかにしたので報告する。

2 材料および方法

2.1 実験動物

実験には平均体重260gのオオクチバスと平均体重60gのブルーギルを用いた。両魚種ともに下関市内の貯水池で採

2005年1月14日受付. Received January 14, 2005.

水産大学校生物生産学科 (Department of Applied Aquabiology, National Fisheries University, 2-7-1 Nagata-honmachi, Shimonoeki, Yamaguchi 759-6595, Japan).

* 別刷り請求先 (Corresponding author).

取し、それぞれ500ℓ水槽に搬入後、一週間以上馴致飼育したのち実験に供した。飼育期間中の水温は、 $25.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ であり、オオクチバスにはコイ稚魚を飽食量、ブルーギルにはコイ育成用飼料（林兼産業）を1日1回、体重の1%量投与した。

2.2 血液塗沫標本およびRomanowsky型染色

血液塗沫標本の作製および染色法は前報⁹⁾にしたがった。

2.3 細胞化学染色

2.3.1 多糖類染色

血液塗沫標本を無水メタノールで5分間固定したのち、30分間風乾して各種多糖類染色を室温（ 25°C ）で行った。多糖類の検出には、periodic acid Schiff (PAS) 染色を行った¹⁰⁾。また、グリコーゲンの鑑別のために、 α -amylase消化した標本のPAS染色を行った¹¹⁾。なお、 α -amylase消化試験の対照として、本酵素を含まない緩衝液中で 37°C 、30分間インキュベートした標本のPAS染色を行った。酸性粘液多糖類の検出には、トルイジンブルー (TB) 染色¹²⁾とアルシアンブルー (AB) 染色¹³⁾を用いた。なお、TB染色液には、蒸留水で溶解したもの他に、大野らの鑑別法にしたがって、pH2.5、4.1および7.0での染色を行った¹⁴⁾。また、AB染色はpH1.0とpH2.5で行った¹⁵⁾。PAS染色標本はマイヤーのヘマトキシリン染色液で核染色を行い、他の染色では核染色を施さなかった。染色標本は風乾後、オキキットで封入して光学顕微鏡で観察した。

2.3.2 脂肪染色

血液塗沫標本を40%中性ホルマリン蒸気で10分間固定した。流水で10分間水洗後、蒸留水に通したのち、直ちに各種脂肪染色を室温（ 25°C ）で行った。脂質の検出にはSudan black B (SBB) 染色¹⁶⁾、中性脂肪の検出にはSudan III染色¹⁶⁾とOil red O染色¹⁷⁾を適用した。なお、核染色は施さなかった。風乾後、グリセリンで封入して光学顕微鏡で観察した。

2.3.3 酵素染色

酸性ホスファターゼ (ACP) の染色には、fast garnet GBC法を用いた¹⁸⁾。また、本酵素の酒石酸抵抗性試験は50mMのL-酒石酸を含む反応液中で行った¹⁸⁾。アルカリ性ホスファターゼ (ALP) 染色は、naphthol AS-MX phosphateを用いたアゾ色素法に依った¹⁹⁾。各種エステラーゼ

の検出には、基質にナフトールASDCLA (N-ASDCLA)、 α -ナフチルアセテート (α -NA) および α -ナフチルブチレート (α -NB) を用いたアゾ色素法を適用した²⁰⁾。なお、 α -NB染色にはNaFによる阻害試験も行った²⁰⁾。 β -グルクロニダーゼ (β -Glu) の染色にはナフトールAS-BIグルクロニドを用いたアゾ色素法を用いた²¹⁾。ペルオキシダーゼ (PO) の検出には、3-3 diaminobenzidine tetrahydrochloride法を適用した²²⁾。いずれの魚種の場合も染色は室温（ 25°C ）で行った。なお、ALP染色標本は1%サフランイン染色液で、他の染色標本はマイヤーのヘマトキシリン染色液で核染色を行った。いずれの染色標本もグリセリンで封入して光学顕微鏡で観察した。

3 結果

オオクチバスおよびブルーギルの好中球は、円形または卵円形であった。前者は長径 $10.5 \sim 13.0 \mu\text{m}$ 、短径 $8.0 \sim 13.0 \mu\text{m}$ であり、後者は長径 $8.5 \sim 13.0 \mu\text{m}$ 、短径 $8.0 \sim 12.0 \mu\text{m}$ であった。核は細胞の中央またはやや偏在していた。核の大きさはオオクチバスでは長径 $5.5 \sim 8.0 \mu\text{m}$ 、短径 $3.5 \sim 5.5 \mu\text{m}$ であり、ブルーギルでは長径 $5.0 \sim 8.0 \mu\text{m}$ 、短径 $3.0 \sim 5.0 \mu\text{m}$ であった。両魚種ともに核は円形、卵円形、楕円形またはソラマメ形であり、分葉核は認められなかった。いずれの魚種においても、好中球顆粒は難染色顆粒 (β 顆粒) と、粗大で不定形の好塩基性顆粒 (δ 顆粒) の2種類に識別された。なお、顆粒の呼称は前報⁹⁾にしたがった。

β 顆粒

本顆粒は難染色もしくは好中性で、いずれの魚種においても長径 $0.5 \sim 1.0 \mu\text{m}$ の円形または卵円形であった。また、各種染色条件下におけるRomanowsky型染色性にも魚種間の顕著な違いは認められなかった。本顆粒は両魚種のいずれの好中球にも多数観察された。

メイ-グリエンワルド (MG) 染色では、いずれの希釈液を用いても本顆粒は不明瞭であった (Fig. 1 a, 1 b, 2 a, 2 b)。MG・ギムザ (MGG) 染色では、pH5.0の緩衝液では本顆粒の観察は困難であったが、他の希釈液を用いた場合には、ギムザ染色液の濃度および染色時間に関わらず本顆粒が観察された (Fig. 1 c, 1 d, 2 c, 2 d)。とくに、オオクチバスではpH7.0の緩衝液を用いた場合に、細胞質基質が淡青色に染まり、 β 顆粒の観察が容易であった (Fig. 1 d)。

ギムザ染色では、いずれの希釈液を用いても、ギムザ染

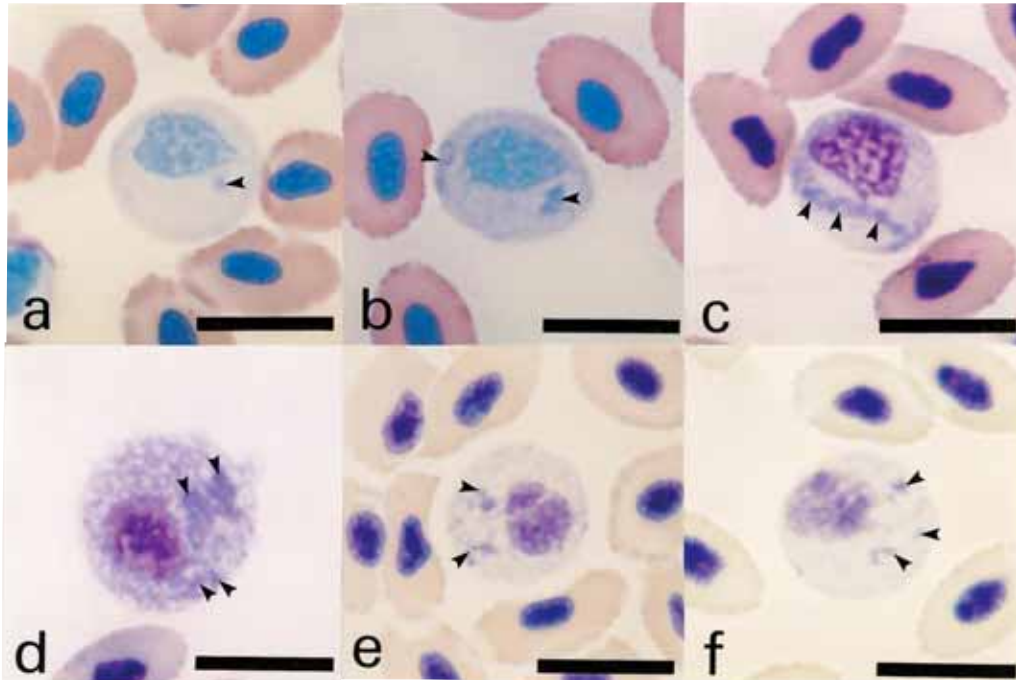


Fig. 1 . Large mouth bass neutrophils under various staining conditions. a, May-Grünwald stain using distilled water (pH5.2). b, May-Grünwald stain using phosphate buffer (5 mM, pH6.0). c, May-Grünwald • Giemsa stain using phosphate buffer ($1/150$ M, pH7.0). Giemsa solution was diluted in $1/150$ M phosphate buffer at a rate of 1 : 100. Giemsa stain was for 15 min. d, May-Grünwald • Giemsa stain using distilled water. Giemsa solution was diluted in distilled water at a rate of 1 : 100. Giemsa stain was for 15 min. e, Giemsa stain (15min) using distilled water. Giemsa solution was diluted in distilled water at a rate of 1 : 100. f, Giemsa stain (15min) using phosphate buffer ($1/150$ M, pH7.0). Giemsa solution was diluted in $1/150$ M phosphate buffer at a rate of 1 : 100. Note β G and δ G (arrowheads). Bars=10 μ m.

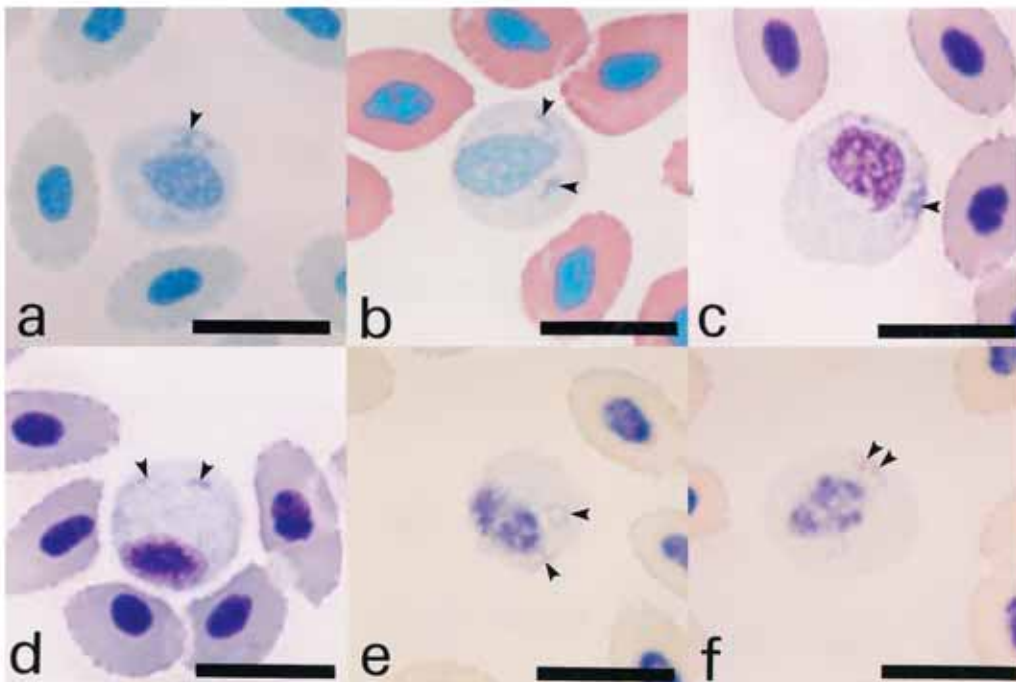


Fig. 2 . Bluegill neutrophils under various staining conditions. a, May-Grünwald stain using distilled water (pH5.2). b, May-Grünwald stain using phosphate buffer (5 mM, pH6.0). c, May-Grünwald • Giemsa stain using phosphate buffer ($1/150$ M, pH7.0). Giemsa solution was diluted in $1/150$ M phosphate buffer at a rate of 1 : 100. Giemsa stain was for 15 min. d, May-Grünwald • Giemsa stain using distilled water. Giemsa solution was diluted in distilled water at a rate of 1 : 100. Giemsa stain was for 15 min. e, Giemsa stain (15min) using distilled water. Giemsa solution was diluted in distilled water at a rate of 1 : 100. f, Giemsa stain (15min) using phosphate buffer ($1/150$ M, pH7.0). Giemsa solution was diluted in $1/150$ M phosphate buffer at a rate of 1 : 100. Note β G and δ G (arrowheads). Bars=10 μ m.

色液の濃度および染色時間に関わらず、本顆粒は不明瞭であった (Fig. 1e, 1f, 2e, 2f)。

δ 顆粒

本顆粒は不定形であり、桿状、コンマ状、三日月状、リング状などの多様な形態を有し、好塩基性 (淡青色) を示した。また、大きさも様々であった。とくに、オオクチバスでは、本顆粒は大きく、形態も前述のものに加え、八字状、鎖状、リボン状などと多様であった (Fig. 1)。本顆粒の数はβ顆粒よりもはるかに少なかったが、両魚種のいずれの好中球にも観察された。また、本顆粒はいずれの染色条件においても観察されたが、MGおよびギムザ染色標本では不明瞭であった。

細胞化学

両魚種ともに、好中球にβ顆粒とδ顆粒の2種類のみが観察されたことから、サンフィッシュ科を代表してブルーギルの細胞化学的特徴について調べた。

ブルーギルのいずれの好中球にも多数のPAS染色陽性顆粒が観察された。陽性顆粒は直径約0.2μmの円形であり、細胞質に均一に分布していた (Fig. 3a)。また、種々の形態を示す粗大な顆粒状の陰性部位も観察された。細胞質基質は淡桃色を示した。緩衝液中でインキュベートした標本では核周囲の陽性顆粒が消失したが (Fig. 3b)、他の部位

の陽性顆粒数には変化は見られず、陽性顆粒の色調は淡赤色となった。一方、基質の染色性には変化は認められなかった。しかし、α-アミラーゼ処理によって、いずれの陽性部位も完全に消失した。ABでは陽性部位は観察されなかった。TB染色では蒸留水の場合、いずれの好中球にも種々の形態を示す青色の粗大な陽性顆粒が少数観察された (Fig. 3c)。pH7.0および4.1の場合も同様であったが、pH4.1では淡青色であった。しかし、pH2.5では陽性部位が観察されなかった。OROおよびSudan IIIでは、陽性部位が観察されなかった。一方、SBBでは多数の円形陽性顆粒 (直径約0.2μm) が細胞質に均一に観察された (Fig. 3d)。

ACP, ALP, β-Glu, α-NB, α-NA, N-ASDCA染色のいずれも好中球に検出されなかった。しかし、POは好中球の細胞質に円形 (直径約0.5μm) の陽性顆粒として認められた (Fig. 3e)。

4 考 察

近年、各種真骨魚類の好中球には、Romanowsky型染色性と形状が異なる複数種の顆粒が存在し、顆粒の種数は魚種によって相違があることが報告されている^{5~9)}。オオクチバスおよびブルーギルの好中球には、β顆粒とδ顆粒が観察されたが、α顆粒とγ顆粒は認められなかった。このことは、メジナの好中球と同様であったが、顆粒の染色

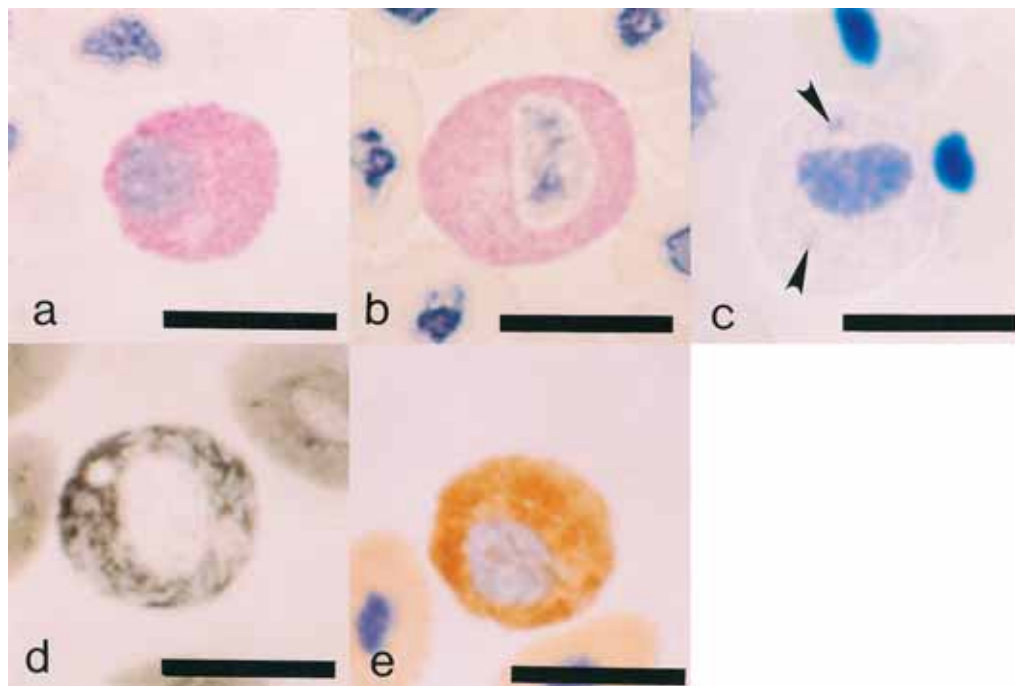


Fig. 3. Cytochemistry of neutrophils from bluegill. a, periodic acid Schiff reaction (PAS). b, PAS after incubation in buffer. c, toluidin blue in distilled water. Note the positive δG (arrowheads). d, Sudan black B. e, peroxidase. Bars=10 μm.

最適条件には若干の相違が認められた。 β 顆粒の場合、MGGおよびギムザ染色標本では、メジナとオオクチバスおよびブルーギルの間に違いは認められなかった。しかし、MG染色標本では、メジナの場合、pH5.0の緩衝液を用いると本顆粒の観察は困難であり、他の希釈液を用いた場合は本顆粒が容易に観察されるのに対して⁹⁾、オオクチバスとブルーギルではいずれの希釈液を用いても本顆粒は不明瞭であった。以上の違いは、 β 顆粒が難染性であることから、その周囲の細胞質基質が充分染色されないと、 β 顆粒の観察が困難であるために起こったものと思われる。また、メジナの δ 顆粒はpH5.0の緩衝液を用いたMG染色では染色性が低い、他の希釈液を用いた場合には本顆粒が容易に観察される⁹⁾。一方、オオクチバスとブルーギルでは、いずれの希釈液を用いてもMGおよびギムザ染色標本では不明瞭であった。このことは β 顆粒の場合とは異なり、 δ 顆粒の染色特性に魚種間における違いが存在することを示している。

ブルーギルの δ 顆粒はメジナと同様の形態を示したが、オオクチバスの本顆粒の形態はブルーギルやメジナよりも多様であった。このことから、魚類における本顆粒の微細構造や機能を調べる場合、オオクチバスが比較対照としてのモデル動物になると思われる。

ブルーギルの好中球には、PAS陽性顆粒が観察された。本顆粒は β 顆粒と同様に、細胞質に多数観察されるが、 β 顆粒が長径0.5~1.0 μm であるのに対して、PAS陽性顆粒は直径約0.2 μm と小型であること、および、 β 顆粒は円形または卵円形であるのに対して、PAS陽性顆粒は円形であることから β 顆粒とは異なる顆粒と考えられる。また、緩衝液中でインキュベートすることによって、PAS陽性顆粒は消失または染色性が低下するとともに、残存する陽性顆粒が α -アミラーゼで完全に消化されることから、PAS陽性顆粒は β 顆粒とは異なり、グリコーゲンが凝集して形成された構造物と考えられる。SBB陽性顆粒についても、PAS陽性顆粒と同様に、大きさと形状の違いから、 β 顆粒とは異なると思われる。TB染色により好中球に種々の形態を示す青色の粗大な陽性顆粒が少数観察された。この顆粒は形態学的特徴から、 δ 顆粒に相当すると思われる。 δ 顆粒はPAS染色に陰性であることから本顆粒のTB陽性物質は酸性粘液多糖とは異なると思われる。POの陽性部位は顆粒のみであり、陽性顆粒は大きく、円形または楕円形であること、陽性顆粒は細胞質に充満していることから、 β 顆粒に相当すると思われる。

コイ目のコイでは α 、 β および γ 顆粒の3種類が認められ、それぞれ、エオシン好性顆粒、難染性または好中性顆粒およびアズール好性顆粒と命名されている^{5, 6)}。ヒトの好中球の中性好性顆粒(好中性顆粒)はエオシンなどの酸性色素にも、アズールやメチレンブルーといった塩基性色素にも染まりにくい性状を示すが、実際には小型のピンク色ないし紫色を帯びた顆粒として観察される²⁹⁾。一方、コイ好中球に認められる β 顆粒は粗大であり、ヒト好中球のようなピンク色ないし紫色を帯びた顆粒としては観察されないことから、好中性顆粒という名称は不適当であり、本顆粒は難染性顆粒と称するのが妥当と考えられる。 β 顆粒は、これまでにナイルティラピア、イサキ、メジナの好中球にも見出されており^{7~9)}、コイと同様に粗大で、明瞭な色調として染色されないことから、これらの魚種の β 顆粒も難染性顆粒と称するのが妥当であり、本研究のオオクチバスとブルーギルについても同様である。また、ヒト好中球のアズール好性顆粒は、好中球が骨髓(造血組織)中であって、前骨髓球の段階ではアズールによって紫褐色ないし紫赤調を呈するが、好中性骨髓球以降には、電子顕微鏡による微細構造の観察から、本顆粒は存在するもののアズール好性は失われる²⁹⁾。一方、コイ好中球の γ 顆粒の色調は淡青色であり、ヒトのアズール顆粒の色調とは明らかに異なることから、 γ 顆粒に対するアズール顆粒という名称は不適当と考えられ、同顆粒は好塩基性顆粒と呼ぶべきであろう。 γ 顆粒はナイルティラピアとイサキにも観察され^{7, 8)}、コイと同様に、その色調は淡青色であることから、それら魚種の γ 顆粒も、好塩基性顆粒と呼ぶのが妥当と考えられる。

δ 顆粒はコイでは観察されず、ナイルティラピア、イサキ、メジナの好中球にも見出されており^{7~9)}、本研究のオオクチバスやブルーギルと同様に多型の好塩基性顆粒として観察される。ヒトでは成熟した好中球の細胞質に好塩基性に染まる斑点が観察され、デーレ(Döhle)小体と命名されている²⁹⁾。この小体は扁平嚢状の粗面小胞体が層をなして密集したものであり、成熟好中球における粗面小胞体の部分的遺残とされており、感染症などの時にしばしば観察されるが²⁹⁾、魚類の δ 顆粒とデーレ小体との関連は不明である。

本研究によって、ブルーギル好中球の β 顆粒はPOに、 δ 顆粒はTBに陽性であることが明らかとなった。今後、他の魚種についても好中球顆粒の染色性の詳細について検討する必要がある。

文 献

- 1) P. M. Hine : The granulocytes of fish. *Fish&Shellfish Immunol.*, 2, 79-98(1992).
- 2) A. J. Ainsworth : Fish granulocytes:morphology, distribution, and function. *Annu. Rev. Fish Dis.*, 2, 123-148(1992).
- 3) N. Borregaard, L. Kjeldsen, K. Lollike and H. Sengelev : Granules and secretory vesicles of the human neutrophil. *Clin. Exp. Immunol.*, 101, 6-9 (1995).
- 4) N. Borregaard and J. B. Cowland: Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*, 89, 3503-3521(1997).
- 5) 近藤昌和・安本信哉・高橋幸則：コイ好中球のメイグリュンワルド・ギムザ染色性. 水産大学校研究報告, 50 (3), 109-117 (2002).
- 6) 近藤昌和・安本信哉・高橋幸則：コイ好中球のアズール顆粒. 水産大学校研究報告, 51 (1), 17-29 (2002).
- 7) 安本信哉・近藤昌和・高橋幸則：テラピア好中球顆粒のメイグリュンワルド・ギムザ染色性. 水産大学校研究報告, 51 (3), 79-86 (2003).
- 8) 近藤昌和・安本信哉・高橋幸則：イサキ好中球の顆粒. 水産大学校研究報告, 52 (1), 45-48 (2004).
- 9) 近藤昌和・金丸俊介・高橋幸則：メジナの好中球顆粒. 水産大学校研究報告, 52 (2), 67-71 (2004).
- 10) 安達真二：PAS反応. 染色法のすべて, 医歯薬出版, 東京, 1990, pp. 242-244.
- 11) 鈴木 裕： α -アミラーゼによるグリコーゲンの消化法. 病理標本の作り方, 文光堂, 東京, 1992, pp. 88-89.
- 12) 林 勇：トルイジン青染色. 病理標本の作り方, 文光堂, 東京, 1992, pp. 78-79.
- 13) 林 勇：アルシアン青染色. 病理標本の作り方, 文光堂, 東京, 1992, pp. 82-85.
- 14) 大野 乾・野附 巖・川井忠和：酸性多糖類の組織化学的研究, ヒアルロン酸の組織化学的確認法. 医学と生物, 19, 326-328 (1951).
- 15) 東 克己：ズダン黒B (SBB) 染色. 染色法のすべて, 医歯薬出版, 東京, 1990, pp. 239-240.
- 16) 金田正昭：ズダンⅢ, ズダンⅣ染色. 病理標本の作り方, 文光堂, 東京, 1992, pp. 105-107.
- 17) 金田正昭：オイルレッドO染色. 病理標本の作り方, 文光堂, 東京, 1992, pp. 108-109.
- 18) 望野唯明・片山 勲：酸ホスファターゼ. 染色法のすべて, 医歯薬出版, 東京, 1990, pp. 218-221.
- 19) 小池 正・古田理英・柴田 昭：アルカリ性ホスファターゼ. 染色法のすべて, 医歯薬出版, 東京, 1990, pp. 207-209.
- 20) 斎藤準一・高久定男・清水 宏：エステラーゼ染色. 染色法のすべて, 医歯薬出版, 東京, 1990, pp. 209-213.
- 21) 木村寿之： β -グルクロニダーゼ染色. 染色法のすべて, 医歯薬出版, 東京, 1990, pp. 221-224.
- 22) 亀井喜恵子：ペルオキシダーゼ染色. 染色法のすべて, 医歯薬出版, 東京, 1990, pp. 213-217.
- 23) 三輪史郎・渡辺陽之輔：血液細胞アトラス, 文光堂, 東京, 2004.